HERB.

1959

INSTITUTO DE MICOLOGIA - UNIVERSIDADE DO RECIFE
(Publicação n. 107)

A. CHAVES BATISTA, M. L. NASCIMENTO
& E. A. F. DA MATTA *

Megaloxyphium ophidioglossum

Cif., Bat. & Nasc.

e seu cultivo artificial nos meios de laboratório

(COM 1 FIGURA NO TEXTO)

FORLÌ
TIPOGRAFIA VALBONESI
1959

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INST.
5 MAY 1959

A. CHAVES BATISTA, M. L. NASCIMENTO
& E. A. F. DA MATTA *

Megaloxyphium ophidioglossum
Cif., Bat. & Nasc.
e seu cultivo artificial nos meios de laboratório

(COM 1 FIGURA NO TEXTO)

MEGALOXYPHIUM OPHIDIOGLOSSUM Cif., Bat. & Nasc.

Empenhados na elucidação do problema das relações metagenéticas entre os fungos Capnodiales e as fórmas imperfeitas que lhes são associados tão frequentemente, as fumaginas, vimos estudando, de há longo, a possibilidade de cultivar tais fungos nos meios artificiais de laboratório.

À proporção que avançamos na pesquisa das características de sistemática de todos os gêneros de *Capnodiales* temos sido levados a investigar também os fungos *Asbolisiaceae*, que se integram no complexo fumagínico, pois ainda é una questão aberta a evolução dêsses fungos.

Numerosas tentativas têm sido efetuadas visando à obtenção de cultivos puros — quer das fórmas típicas de *Capnodiales*, sexuadas, raríssimas vezes obtidas, quer das fórmas imperfeitas, de Asbolisiaceae, igualmente difíceis de logradas, se é que já o foram, naquele carácter.

Deixados à margem todos os outros aspectos da biologia dêsses fungos, preocupamo-nos em conseguir, através da semeadura de ascosporos de *Trichomerium, Capnodium, Achaetobotrys, Chaetopotius,* o desenvolvimento reversivo de algum estágio de *Asbolisiaceae*, sem sucesso. Orientâmo-nos, então, no sentido inverso, buscando, com o cultivo de

* Do Instituto Biológico da Bahia.

Asbolisiaceae, a produção de estágios sexuados de *Capnodiales*. Foram baldados todos os nossos esforços, inicialmente, desde quando as semeaduras de Asbolisiaceae, quer sob fragmentos de micélio, quer sob a deposição de picnidiosporos, resultavam sempre negativas ou como cultivos mixtos, impurificáveis, na prática.

Em 1956, depois de explorar sem êxito o cultivo de uma nova espécie de Asbolisiaceae, Cif, Bat. & Nasc. descheveram na sob o binômio de *Megaloxyphium ophidioglossum* (Publ. n. 47, Inst. Micol. Univ. Recife).

A hipótese de que algum fator climático governaria a viabilidade da germinação dos picnidiosporos dêsse interessante fungo levou-nos a repetir as semeaduras de picnidiosporos e micélio, mensalmente, no Recife e em Salvador. Por fim, no período de Outubro e Novembro de 1957 logramos, quase ao mesmo tempo, cultivar *M. ophidioglossum*, tanto no Recife quanto em Salvador, utilizando inóculo proveniente do mesmo hospedeiro *Hibiscus rosa-sinensis*.

As culturas puras então alcançadas permitiram-nos apreciar o comportamento dêsse organismo sôbre diferentes meios artificiais de laboratório, com as suas diversificações de morfologia, mas não originaram até agora, siquer esboços de estruturas sexuadas. De qualquer maneira, parece-nos que os dados recém-obtidos têm significação importante para o eventual esclarecimento das condições próprias para a viabilidade dos cultivos artificiais dos fungos de fumagina. Aparentemente, funcionariam os fatores bioambientais como intervenientes na completa formação de reservas estimulativas da moltiplicação de estruturas de fungos dêsse grupo, nos meios de laboratório. O índice de humidade relativa do ar, menor do que 60%, a temperatura do ar de 24-26°C e a do solo de quase 30°C, interfeririam sôbre o fungo diretamente, permitindo lhe enrique cimento maior das substâncias nutritivas, ao passo que o hospedeiro, exposto às mesmas condições climáticas e mais ainda a um alto coeficiente de luminosidade e sobretudo de exsudação, garantiria, nesse caso, os necessários fatores de crescimento, ajustadores de uma pronta maturidade das estruturas fúngicas que hospeda. Isso explicaria os resultados positivos atingidos nos cultivos de *M. ophidioglossum* sòmente no período de Outubro a Fevereiro, em que são prevalentes os requisitos bioambientais ora sumarizados.

Da semeadura de pequenos fragmentos de micélio ou de picnidiosporos de *M. ophidioglossum* advém o início da costituição de colônias já ao 3° dia, nos meios usuais de laboratório. De então por diante processa-

se o desenvolvimento dessas colônias, em placas de Petri, conforme relatamos a seguir, para as condições de temperatura ambiente de 23-25°C.

Sôbre Sabouraud-agar. — Aos lo dias as colônias têm 2,5 cm de diâm., apresentando-se rotundas, negras, velutinas, de área central irregularmente elevada e bordos radialmente sulcados, recobertos de uma poeira esbranquiçada, de picnidiosporos imaturos, ainda hialinos, portanto; há também exsudato hialino por tôda a superfície das colônias; reverso liso, negro, de margens cinéreas.

Aos 30 dias o micélio mostra-se sub-hialino a marron-claro, septado, constricto, não setoso, sem hifopódios; as hifas têm ramificações irregulares muito entrelaçadas; muitas delas erguem-se do substrato adquirindo porte erecto, ao redor dos picnídios; células hifais cilindráceas de 8-20 × 3,5-5 μ.

Picnídios marron-negros, cilindráceos, erectos, direitos 300-500 μ de altura; ápice dilatado, fimbriado, de 29-40 μ. de diam; base 24-30 μ; subparenquimáticos, de paredes formadas por células retangulares de 7,5-18 × 3,5-6 μ; são simples, raramente múltiplos ou ramificados.

Picnidiosporos hialinos a princípio, depois marron-claros, contínuos, lisos, formando cirro sôbre o ápice dos picnidios: 5-8 × 3,5-6 μ.

Sôbre batata-dextrose-agar. — Aos 10 dias as colônias são rotundas, de 2 cm de diam. verde negras, centro elevado e margens radialmente sulcadas, verde, recobertas por uma substância gelatinosa, subhialina; exsudato hialino abundante; reverso liso, negro. Aos 30 dias o micélio apresenta-se intricado, com hifas septadas, constrictas, muito ramificadas irregularmente, subhialinas a marron-claras, repentes e erectas, por tôda a superfície das colônias; as células hifais são cilíndráceas, de 8-21 × 3-6 μ.

Picnídios marron-negros, cilindráceos, erectos, direitos ou encurvados comumente simples, 182-1615 μ de altura, raramente ramificados, múltiplos ou com hifas ramificadas que se geram no ápice picnidial e sustentam conídios. Ápice fimbriado de 24-27 μ de diâmetro e 16-25 μ de diâmetro basal. Picnidiosporos numerosos, cilindráceos a ovoides, contínuos, comumente hialinos, raros de côr marron amarelada 5-7 × 3-4 μ.

Sôbre Czapek-agar a 20 % Aos 20 dias. As colônias são circulares, 32 mm de diâmetro, verde-negras, de centro elevado e aspecto feltroso; bordos menos densos, de côr verde-musgo.

Exsudato hialino revestindo as colônias por inteiro. Reverso liso, negro, de bordos verde-claro.

Aos 30 dias estas colônias apresentam-se com uma zona central bem elevada (5 mm aproximadamente) de côr verde-musgo, 2-2,5 cm de diâm., semi-velutinas; uma zona mediana marron-negra, feltrosa, ligeiramente sulcada no sentido radial, de 10-13 mm de raio; bordos planos, menos densos, de tonalidade marron. O micélio é subhialino a marron-claro, septado, constricto, não hifopodiado, de ramificações irregulares, com células de 8,5-15 × 3,5-5 μ; hifas ascendentes, hialinas a subhialinas, em tôda a colônia, sendo mais abundantes na área central.

Picnídios apresentam-se de duas fórmas bem distintas. Na área central das colônias são marron-negros, de pequena altura, 480-750 μ membranosos, subparenquimáticos de células parietais, retangulares, de 6-15 × 4-6,5 μ, cilindráceos, com 21-25 μ de diâmetro basal; o ápice apresenta numerosas hifas subhialinas formadas de células de 7,5-17 × 4-6,5 μ, de ramificações arborescentes, estéreis; essas hifas também reunem-se formando pseudoprolongamentos picnidiais estéreis, de extremidade hialina, ramificados, 6-10 μ de diam; não são dilatados nem fimbriados.

Na região marginal das colônias, os picnídios são gelatinosos, densamente gregários e entrelaçados, marron-claros, encurvados, cilindráceos, comumente simples ou ramificados, nunca múltiplos, 700-1250 μ, de altura; ápice fimbriado, pouco dilatado, 27-30 μ de diâmetro; a base é de 40-104 μ de diâm; células parietais, pouco distintas, retangulares, de 7,5-23 × 3-9 μ; Também exibem no ápice hifas ramificadas, que não sustentam conídios, entretanto.

Picnidiosporos hialinos a princípio, numerosos, depois marron, contínuos, formando cirro marron-negro aderido ao ápice ou à porção central dos picnídios; medem de 6,5-10 × 3,5-6 μ.

Aos 50 dias do plantio, os picnídios da região central das colônias apresentam-se com as ramificações apicais recobertas de picnidiosporos, enquanto os-pseudo-prolongamentos apicais dos picnídios, vistos desde os 20 dias são agora verdadeiros picnídios múltiplos, contendo picnídiosporos ainda hialinos. Também numerosos apelotonamentos de picnidiosporos marron são encontradiços na superfície dos cultivos. Os picnídios, nessa idade de 50 dias ultrapassam de 1400 μde altura.

Sôbre malte-agar. — Aos 20 dias o micélio é subhialino a marron-claro, septado, constricto, não setoso, nâo hifopodiado, de ramificações irregulares, com células de 7-12,5 × 4-6 μ; há hifas erectas e ascendentes em tôda a colônia, muitas delas revestindo as paredes dos picnídios.

Picnídios marron, cilindráceos, erectos, direitos ou encurvados 218-1750 μ de altura; ápice dilatado, fimbriado ,de 18-43 μ de diâmetro; em alguns picnídios observa-se no ápice a formação de hifas subhialinas, de ramificações arborescentes, em cujas células da extremidade observa-se um esbôço de picnídio múltiplo; as células dessas hifas são de 4-10 × 2,5-3,5 μ; as paredes picnidiais apresentam-se subparenquimáticas, de células retangulares, distintas, de 6-30 × 3,5-7,5 μ.

Os picnídios têm diam. basal de 27-35 μ. São simples, múltiplos ou ramificados. Picnidiosporos contínuos, numerosos, de 6-9 × 3,5-6 μ.

Dos meios empregados o de malte-agar é o que melhor favoreceu ao alongamento picnidial cujas proporções corresponderam ao tamanho máximo dos picnídios assinalados sôbre *Polyscias gneyfoilei* Bailey, em acordância com a diagnose original.

O meio de Czapek-agar a 20 % foi o mais adequado para a produção dos picnídiosporos, cujas dimensões alcançaram de 6,5-10 × 3,5-6 μ, um pouco mais desenvolvidas do que normalmente acontece sôbre os hospedeiros naturais e outros meios de cultura artificial. Observamos também a constância da variabilidade da morfologia dos picnídios, segundo os limites previstos para a estabilidade dessa espécie, que é o tipo do gênero *Megaloxyphium*. Em nenhum dos meios de cultura estudados foi possível a formação de esclerócios ou de peritécios.

RÉSUMÉ

Ce travail donne les résultats de l'etude d'un champignon de fumagine (*Megaloxyphium ophidioglossum* Cif., Bat. & Nasc.) en culture artificielle. Après une longue période d'insuccès, champignon mensuellement semé en culture artificielle dans deux zones géographiques du Brésil, se développe dans les milieux de laboratoire seulement pendant les mois secs, chauds, d'octobre-février 1957-1958. Les auteurs supposent qu'il y ait quelques facteurs de croissance dans le métabolisme du champignon pendant cette période. Ils admettent que la richesse minérale de l'exsudat de l'hôte dans cette époque soit favorable au développement naturel du champignon, lequel pourra alors croître aussi dans les milieux artificiels de laboratoire.

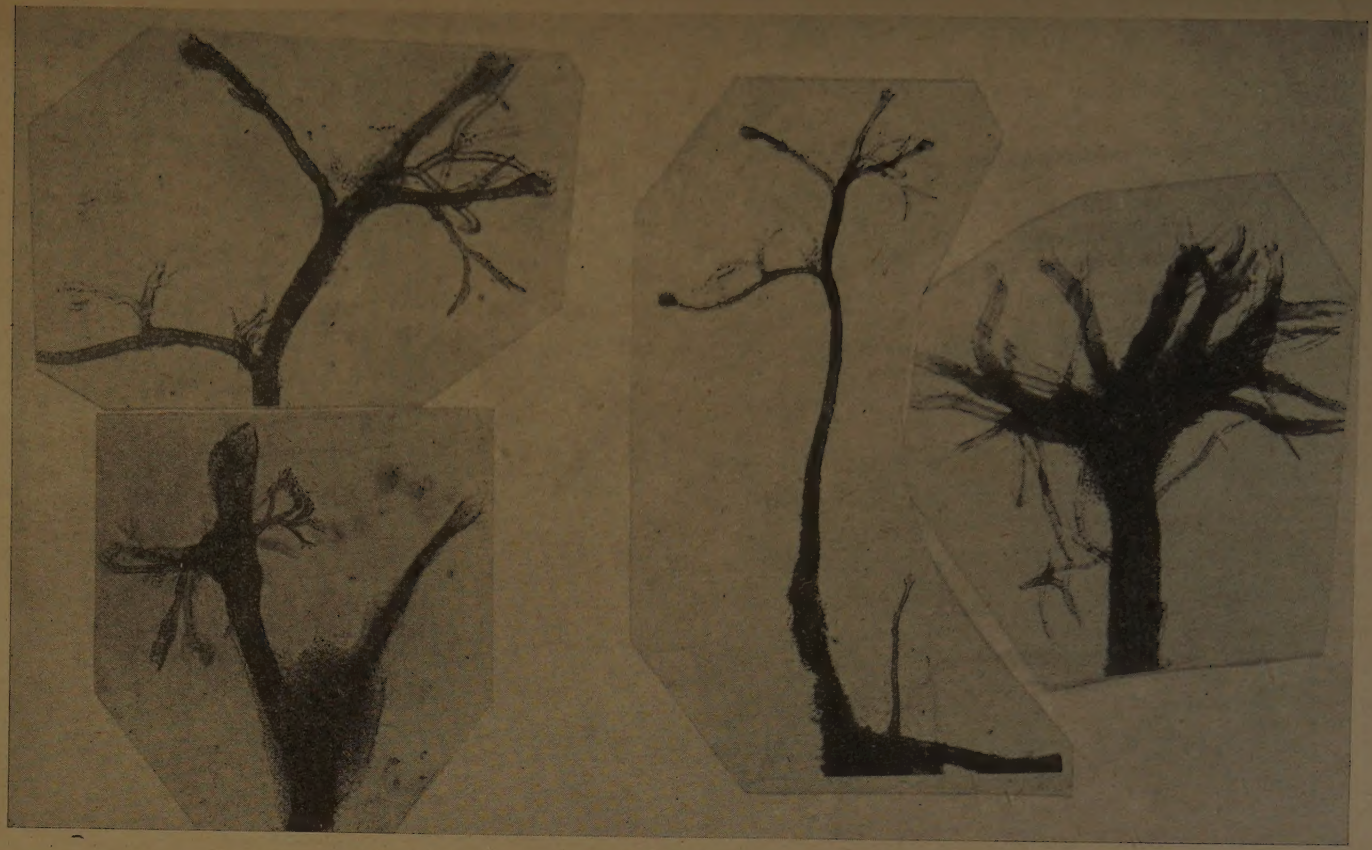
M. ophidioglossum a été étudié en Sabouraud-agar, pomme de terre-dextrose-agar, malte-agar, et Czapek-agar 20 % jusqu'à 50 jours. La stabilité de cette polymorphes espèce a été confirmée dans les limites antérieurement décrites. Pas de transformations des pycnides en périthèces, ou apparition de sclérotes.

SUMMARY

This paper claims the first positive results for the sooty-mold fungus *Megaloxyphium ophidioglossum* Cif., Bat. & Nasc. in pure artificial culture media. After a long period of unsucessful trials in two distinct geographic areas of Brazil, the fungus very well developed during the dry and hot months of october-february 1957-1958. The AA. suppose that there are some growth factors in the fungus metabolism necessary for the artificial culture, probable some mineral compound in the exsudate of the host.

The *M. ophidioglossum* has been cultivated on Sabouraud-agar, potato-dextrose-agar, malt-agar and Czapek-agar, 20 % to 50 days. The stability of this polymorph species has been confirmed under the conditions previously described. Pycnidia were not evoluted to perithecia, nor sclerotia were formed.

Reprint from **Atti Ist. Bot. Lab. Critt. Univ. Pavia** Serie 5, Vol. **XVI,** pag. 97-103, 1959



ESTAMPA I.

Megaloxyphium ophidioglossum Cif., Bat. & Nasc.
sôbre Sabouraud-agar, aos 30 dias.

(no meio) Aspecto geral do picnídio;
(á direita) detalhe da ramificação da porção terminal do picnídio;
(á esquerda, ao alto) picnídio formado sôbre o meio de Czapek, a 20 %, aos 30 dias;
(á esquerda, em baixo) picnidio sôbre malte-agar, aos 30 dias.